

ミエリン塩基性蛋白質の分子生物学的解析

著者	有賀 純
号	1085
発行年	1991
URL	http://hdl.handle.net/10097/20479

氏 名（本籍）^{あり}有^が賀^{じゅん}純

学 位 の 種 類 医 学 博 士

学 位 記 番 号 医 博 第 1 0 8 5 号

学位授与年月日 平 成 3 年 3 月 28 日

学位授与の条件 学位規則第 5 条第 1 項該当

研 究 科 専 攻 東北大学大学院医学研究科
(博士課程) 病態科学系専攻

学 位 論 文 題 目 THE Molecular Biological Studies of Myelin
Basic Protein—The Modes of Gene Expression
in normal and myelin Deficient Mice.
(ミエリン塩基性蛋白質の分子生物学的解析)

(主 査)
論文審査委員 教授 岡 本 宏 教授 林 典 夫
教授 柴 原 茂 樹

論 文 内 容 要 旨

ミエリン塩基性蛋白質 (Myelin Basic Protein, MBP) は中枢神経系ミエリンの主要な構成蛋白のひとつである。MBPはミエリン膜の内側どうしの融合に関与しているものと考えられている。

第一部 マウスミエリン塩基性蛋白質の新しいアイソフォームの同定

マウスMBP遺伝子は7個のエキソンにより構成され、約30kbの領域を占めている。最近の研究によりマウスでは5種類のMBPのmRNAの存在することが確認されている。これらはエキソン2, 5, 6の選択的使用 (alternative use) により生じる。このうち20kDaタイプは蛋白質レベルでは存在が確認されているが実体は不明であった。そこでポリメラーゼ・チェーン反応 (Polymerase Chain Reaction, PCR) を用いた系によりマウスMBPの新しいアイソフォームを検出することにした。

BALB/cマウスの脊髄RNAより単鎖cDNAを合成し、これをテンプレート (鋳型) として、PCR法によりMBPのcDNAを特異的に増幅した。PCR産物をサザンブロット解析した。その結果従来の21.5kDaタイプと18.5kDaタイプに相当するバンドの間に20kDaに相当するバンドが認められた。

このバンドに相当する部分のDNAをクローン化した結果、今まで報告のなかった2種類のcDNAが同定された。各クローンは従来の18.5kDaタイプ、17kDaタイプに66bpの未知の配列が挿入されたものであった。遺伝子の解析からこの66bpの配列はエキソン5の5'近接領域に位置していることが明らかになった。申請者らはこの配列をエキソン5aと命名し、このエキソンは従来のエキソン5 (エキソン5b) と融合した99bpのエキシオンを形成するものと考えた。

エキソン5aの挿入によって翻訳の読み枠はくずれず、従来の17kDaタイプ、18.5kDaタイプにアミノ酸22残基よりなる疎水性の領域を付加することが明らかになった。2次構造予測ではこの領域はベータ・シート形の構造をとることが予想された。

RNase protectionにより、全脳、脊髄、坐骨神経におけるエキソン5aの使用頻度を検討したところ、全組織においてこれを検出することができ、脊髄に比較的多く存在していることが確かめられた。

第二部 ミエリン形成不全症の分子生物学的研究

マウスMBP遺伝子は7個のエキソンによりコードされ約30kbの領域にわたっている。このMBP遺伝子に変異を持ったミュータントマウスが報告されている。シバラー (shiverer) とミエリン形成不全 (myelin deficient, mld) マウスは常染色体劣性の遺伝形式をとるミュータント

マウスであり、MBPの発現異常を特徴としている。両者とも企図振戦等の行動異常を特徴としている。

mldではMBP遺伝子が直列に重複しており上流の遺伝子のエキソン3から7までを含む部分が逆転している。MBPの発現はわずかながら認められ、正常の3%程度である。以前の解析からこの発現低下は主にmRNAレベルで起こっていること、その原因はプロモーター部分の変異によるものではないことがわかっていた。我々は上流の遺伝子の逆転した部分からアンチセンスRNAが生成され、それがMBP発現低下の原因であろうと予想した。

最初にmld脳内でアンチセンスRNAが検出されるか否かをRNase protection法により検討した。エキソン3のセンスRNAをプローブとしてRNase protectionを行ったところ、予想されたサイズのバンドが現れ、容易にアンチセンスRNAを検出することができた。

次にRNase protectionを改変した方法により、アンチセンスRNAがセンスRNAと二重鎖を形成しているかどうかを調べた。その結果、予想された通りアンチセンスRNAは二重鎖を形成しており、核内に局在することがわかった。このアンチセンスRNAはセンスmRNAの核から細胞質への移行を阻害し、MBP発現抑制に寄与するものと考えられた。

更にmld遺伝子座の構造を正確に把握するため、またmld遺伝子座の生成機構を検討するためmld及び正常のMBP遺伝子のコスミドクローニングを行った。その結果、数個のコスミドクローンによりmldのMBP遺伝子座の約100kb、正常MBP遺伝子座の約85kbにわたる領域がクローニングされた。次に制限酵素地図を作製、塩基配列の決定を行い切断点を決定した。

mld遺伝子座には3個の切断点が認められ、上流の遺伝子と下流の遺伝子の間には1.4kbの程度の繰り返し配列が挿入されていた。mld遺伝子座は重複、逆位、未知のスペーサー配列の挿入を伴う多重組換えの産物であると考えられた。またシバラー変異における切断点との比較より、比較的変異の集中する領域が見いだされた。

審 査 結 果 の 要 旨

ミエリン塩基性蛋白質 (MBP) は中枢神経系ミエリンの主要な構成蛋白である。

本論文の第一部で著者はマウスミエリン塩基性蛋白質の新しいアイソフォームを同定した。BALB/cマウスの脊髄RNAより単鎖DNAを合成し、これを鋳型として、PCR法によりMBPのcDNAを特異的に増幅してサザンブロット解析した。その結果従来の21.5kDaタイプと18.5kDaタイプに相当するバンドの間に20kDaに相当するバンドが認められた。このバンドをクローン化した結果、今まで報告のなかった2種類のcDNAが同定された。各クローンは従来の18.5kDaタイプ、17kDaタイプに66bpの未知の配列が挿入されたものであった。この挿入は翻訳の読み枠を変化させずにアミノ酸22残基よりなる疎水性の領域を付加する。遺伝子の解析からこの66bpの配列はエクソン5の5'近接領域に位置していることが明らかになった。著者はこの配列をエクソン5aと命名し、このエクソンは従来のエクソン5 (エクソン5b) と融合した99bpのエクソンを形成するものと考えた。

第二部で著者はミエリン形成不全症の分子生物学的研究を行った。シバラー (shiverer) とミエリン形成不全 (myelin deficient, mld) マウスは常染色体劣性の遺伝形式をとるミュータントマウスであり、MBPの発現異常を特徴としている。両者とも企図振戦等の行動異常を特徴としている。マウスMBP遺伝子は7個のエクソンによりコードされ約30kbpの領域にわたっているが、mldのMBP遺伝子は重複しておりしかも上流の遺伝子のエクソン3から7までを含む部分が逆転していた。著者は上流の遺伝子の逆転した部分からアンチセンスRNAが生成され、これがMBP mRNAの核から細胞質への移行を阻害してMBP発現低下をひき起こすのであろうと予想した。実際にmld脳内でアンチセンスRNAが検出されるか否かをRNase protection法により検討したところアンチセンスRNAを検出することができた。次にアンチセンスRNAがMBP mRNAと二重鎖を形成しているかどうかを調べたところ、予想された通り二重鎖を形成しており、核内に局在した。さらにコスミドクローニングにより得られたmldのMBP遺伝子座の約100kbpと正常MBP遺伝子座の約85kbpにわたる領域を比較することにより切断点を決定した。またシバラー変異における切断点との比較より、比較的変異の集中する領域を見いだした。

以上本論文はミエリン塩基性蛋白質の研究に重要な新知見をもたらしたもので学位論文に値すると思われる。